

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : **59-033223**

(43)Date of publication of application : **23.02.1984**

(51)Int.CI.

**A61K 35/12**

**// A61K 35/23**

**A61K 35/34**

**A61K 35/36**

**A61K 35/37**

**A61K 35/38**

**A61K 35/42**

(21)Application number : **57-143340**

(71)Applicant : **KOKEN KK**

**OISHI TADAKATSU**

**TAJIMA TOMOYUKI**

**NAGANUSHI YOUICHIROU**

(22)Date of filing : **20.08.1982**

(72)Inventor : **TAJIMA TOMOYUKI**

**(54) AGENT FOR SUPPRESSING PROLIFERATION OF MALIGNANT TUMOR CELL OF MAN**

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare the titled suppressing agent having little side effect, by culturing human malignant tumor cell, removing the malignant tumor cells from the culture medium, and extracting the medium.

**BEST AVAILABLE COPY**

CONSTITUTION: Variety of established cells of cultured cells separated from malignant tumor of man (e.g. established cell HRC originated from human kidney cell carcinoma) are proliferated in a proliferation medium (e.g. BME added with 10% of newborn bovine serum or RPMI1640 added with 5% of newborn bovine serum) in an incubator until the growth of the cell is saturated. The medium is washed once to remove the serum. The product is cultured in an extraction medium (e.g. BME free from serum) at 37°C for 3W4 days, and the medium is collected, and treated with molecular sieves of 10,000, 1,000 and 500. The filtrate is collected to obtain the objective agent for suppressing the proliferation of the human malignant tumor cell.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (JP)  
 ⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
 昭59—33223

⑤ Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和59年(1984)2月23日
A 61 K 35/12	ADU	7138—4C	
# A 61 K 35/23		7138—4C	発明の数 1
35/34		7138—4C	審査請求 未請求
35/36		7138—4C	
35/37		7138—4C	
35/38		7138—4C	
35/42		7138—4C	

(全 12 頁)

⑬ 人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤

⑭ 出 願 人 大石忠勝

京都市伏見区中島秋ノ山町55—1

⑮ 特 願 昭57—143340

⑯ 出 願 人 田島知行

⑰ 出 願 昭57(1982)8月20日

市川市八幡6—5—15

⑱ 発 明 者 田島知行

⑲ 出 願 人 長主陽一朗

市川市八幡6—5—15

大和市中央3丁目9番4号

⑳ 出 願 人 興研株式会社

㉑ 代 理 人 弁理士 竹本松司

東京都千代田区四番町7番地

明 細 書

1. 発明の名称

人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤

2. 特許請求の範囲

人の悪性腫瘍細胞の培養液から前記悪性腫瘍を除いて抽出したものであることを特徴とする人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

この発明は人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤に関する。

この発明は人の悪性腫瘍細胞を培養し、その培養液から前記悪性腫瘍細胞を除いて抽出したもので、人の腫瘍細胞に対し、増殖抑制や細胞致死効果を特異的に有するものである。この悪性腫瘍細胞増殖抑制物質は、低分子の物質であり、分子量1000の分子を隔り分けるアミコン柱のY

に対する増殖抑制力とは著しい差異があり、正常細胞に対して致死効果が認められないことから、この発明により製された悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、従来の抗腫瘍剤のような副作用はほとんどないと考えられる。

また、人の悪性腫瘍細胞に人の正常細胞を混合培養してもその培養液から抽出したものが同様の効果が得られる。そして、混合培養液の抽出と新鮮培養液との比率を変えれば、正常細胞は増殖し、悪性腫瘍細胞の増殖は著しく低下させることができる。

次に、この発明の効果を証明するために実験方法について述べる。

実 験 1

1) 実験材料とした細胞

人の悪性腫瘍より分離した多種類の培養細胞株

樹立細胞株HMSの5種類を使用した。

## 2) 培 基

成長用培地には10%牛新生児血清を添加したBasal Medium Eagle (BME) および5%牛新生児血清を添加したRPMI 1640を成長用培地 (growth medium) として用い、抽出用の培地としては、血清無添加のBMEを使用した。

まず成長用培地を用い、培養器に細胞懸液になるまで悪性腫瘍細胞を増殖し、その後1回洗って血清を除く。次に、これを抽出用培地にてそのまま3～4日間37℃にて培養するか、または通常の継代培養の如く、前記増殖細胞のうちから既知の細胞数を新たに抽出用培地に置き換えて3～4日間37℃にて培養し、その培地を採取する。

## 3) 部分精製

採取した培地を10000、1000、500の分子篩にかけ、濾過液を採取する。

## 4) 悪性腫瘍細胞増殖抑制剤の検定法

検定に使用した細胞は実験材料に用いた5種類の癌細胞、および6才の正常人男子前胸部皮膚

グルコース、アミノ酸、ビタミン、血清10%を添加した培地を用い、対照群は新鮮培地BMEに実験群と同等の栄養成分を添加したものを用いた。細胞の初期密度は $1 \times 10^4$  cells とし、第1図の実験では35mmの培養器を、第2図～第5図の実験では15mmの培養器を用いた。

第1図の実験はヒト腎臓癌由来樹立細胞HRCの経日的変化を調べたもので、対照群の細胞は増加しているのに比べ、ヒト腎臓癌由来樹立細胞HRC培養液培地より抽出した物質を含む実験群は、増殖が抑制されていることが明らかに示されている。

第2図Aは正常ヒト2胚体皮膚線維芽細胞NAS63の経日的変化を、第2図Bはヒト腎臓由来樹立細胞MKの経日的変化を調べたもので、いずれも実験群にはヒト腎臓由来樹立細胞MKの培養液培地より抽出した物質を含む培地を用いた。

特開59-33223(2)

より採取した正常ヒト2胚体皮膚線維芽細胞NAS63を用い、その増殖状況を成長曲線および強度反応曲線に表わして調べた。

## a. 成長曲線

既知の細胞数を培養器に播き、濾過液みの抽出用培地にBME培地と同組成、同量のグルコース、アミノ酸、ビタミンを加え、さらに新鮮な前述の血清を10%添加したものを成長用培地として用い、経日的に細胞数を測定するか、または一定期間培養した後、細胞数を調べる。

## b. 強度反応曲線

培養液培地および新鮮培地を各種割合で混合し、成長曲線と同様に各種栄養を加えて一定期間培養した後、細胞数を調べる。

## 5) 実験結果

第1図～第5図は各種癌細胞の培養液培地における細胞増殖の経日的変化を成長曲線に表わしたものである。いずれの実験においても、実験群は各種悪性腫瘍細胞の培養液培地をアミコンYM5 (M. W. 10<sup>3</sup>) で限界濾過後、栄養源として

第3図は、ヒト肺癌由来樹立細胞PC-1の経日的変化を調べたもので、ヒト肺癌由来樹立細胞PC-1の培養液培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は減少し、致死効果が認められる。

第4図は、ヒト口腔癌由来樹立細胞KBの経日的変化を調べたもので、ヒト口腔癌由来樹立細胞KBの培養液培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は、一時的に増加するが、やがて減少する。

第5図は、ヒト筋原性肉腫由来樹立細胞HMSの経日的変化を調べたもので、ヒト筋原性肉腫由来樹立細胞HMSの培養液培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は減少し、致死効果が認められる。

第6図、第7図は、ヒト腎臓癌由来樹立細胞HRCの培養液培地と新鮮培地の各種混合比における強度反応を調べたもので、第6図はヒト腎

特開昭53- 33223 (3)

際であるアミコン製 YM 2 により分離したものを使用し、百分比は培養細胞と新鮮細胞との類に対して培養細胞の含まれる割合を示している。これらの図より、培養細胞は正常細胞にも増殖抑制反応を示すが悪性腫瘍の一併であるヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC には増殖抑制効果がより強く認められる。

表 1 は、限外濾過法による各分子組の分離 (fraction) の細胞増殖の効果を比較したもので、正常ヒト 2 倍体皮膚線維芽細胞 NAG 3 と、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC を用いている。表中①、②、③はグループの番号を示し、④、⑤の分子組 (M. W. ) 10<sup>5</sup> 以下の分組に特異的にヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC に対して増殖抑制および致死効果を持つものが存在する。ただし、この分組は正常細胞へも影響を与えるが、形態的観察では正常細胞に対する致死効果は認められない。

MF を用い、4 日間 37℃ にて培養後、培養液を採取する。

### 3) 透析、凍結

採取した培養液をヴィスキングチューブ (セロファン) でできたチューブで通常の透析に用いるものに替え、外側をポリエチレン・グリコールにて包み、水分を抽出して凍結する。その後、10mM 重炭酸ナトリウム添加緩衝イオンにて透析を行う。

### 4) 細胞増殖抑制剤の検定法

検定に用いる癌細胞は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC 及び人の口腔底癌より樹立したヒト口腔底癌由来樹立株細胞 KB を用いた。採取した培養液及び透析した培養液をシャーレ内の 10% 血清添加新鮮培養地に添加したものを、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 HRC 及びヒト口腔底癌由来樹立株細胞 KB の 2 種の癌細胞及び正常ヒト線維芽

## 実 験 2

### 1) 実験材料としての細胞

53才、及び53才の正常人の男子前胸腺皮膚より採取した正常ヒト2倍体皮膚線維芽細胞、及びヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを用いた。

### 2) 培 養

培地には、10%牛新生児血清を添加した Basal Medium, Eagle (BME) を用いた。培養条件は、閉鎖系または5%CO<sub>2</sub>、100%湿度の大気中で行なう開放系を用い、37℃で培養した。

混合培養は、上記培地で、まず、人の線維芽細胞を培養する。培養器に細胞が一面まで密着して生えた状態になったとき、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを10<sup>7</sup>~2×10<sup>7</sup>個接種する。なお、このとき用いる培養液は、新鮮Roux液(ルービン)といわれるものを使用する。そして、混合培養時には前記Roux液から高記10%牛新生児血清を添加し、新しく使用する培地は、前述の10%牛新生児血清添加、または血清無添加のB

%新鮮血清添加通常培地、正常細胞培養後に10%血清を添加した培地、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞培養後の培地及び混合培養培地の各種条件の培地を使用し、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを増殖した時の日数に対する細胞数を対照曲線で、混合培養後培地で培養したときのみ、細胞増殖抑制及び破壊が認められる。

第9図は、第1図と同様な各種培地の培地を使用し、正常ヒト細胞増殖細胞を培養したもので、混合培養後培地においても日数に対する細胞数は増殖傾向を示す。

第10図は、混合培養を血清無培地で行ない、その培地に10%新鮮血清を添加したものと10%血清添加通常培地とHRC培養後の血清無培地培地とにヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを培養したもので、この結果より血清無培地にて混合培養を行なうと、同様の効果が認められることである。

# 特開昭59- 33223(4)

る。

第11図は、混合培養培養地と10%血清添加新鮮通常培養地との和に対する混合培養培養地の各種の細胞比率による混合を行なったときのヒト胎盤胎芽細胞、及びヒト胎盤胎芽細胞由来樹立細胞の増殖率を示したものである。正常細胞は一定比率では正常細胞培養地より高い増殖率を示し、癌細胞は対数的に増殖率が低下する。

第12図は、第4図と同じ培養地またはHRC培養培養地と10%血清添加通常培養地に対する混合培養培養地またはHRC培養培養地における他の細胞種であるヒト胎盤胎芽細胞由来樹立細胞の増殖率を示したもので、混合培養培養地の方がその混合比率が高くなるほど増殖率が高くなる。したがって混合培養培養地は、癌細胞増殖抑制に寄与しており、この抑制は物質によって惹起されることを表わしている。

第13図は、無血清培養培養地にて、混合培養を行なった培養培養地を遊離したもの10%血清添加通常培養地と、HRC培養培養地と、10%血

清添加通常培養地との混合割合に対する5日間のHRCの細胞数の変化を調べたもので、混合培養培養地抽出物を添加した培養地に著明な細胞増殖抑制効果が認められた。

なお、人の胎盤芽細胞や癌細胞は様々なものがあり、一種類に限らず、同様の効果が認められる。しかし、正常細胞と癌細胞の混合比率により、力価の変化が認められ、上記実験から、正常細胞7000~10000万に対し、癌細胞10000万~20000万を接種するのが好ましいと考えられる。参考のため、第14図、第15図を添付する。

第14図は、10%血清添加通常培養地と混合培養培養地との和に対する混合培養培養地の割合を横軸にとり、混合培養の癌細胞HRCと同様の癌細胞HRCの接種数をそれぞれ変化させた混合の5日間の癌細胞数を縦軸に示したものであって、癌細胞接種数が多いほど、また、混合培養培養地の割合が高いほど癌細胞数が少なくなっている。

第15図は、10%血清通常培養地と混合培養培養地との和に対する混合培養培養地の割合を横軸にと

り、混合培養の癌細胞HRCと残った癌細胞KBの接種数をそれぞれ変化させた混合の5日間の癌細胞数を縦軸に示したものであって、癌細胞が異なるものであっても、第14図に示す傾向が見られることを示している。

また培養地の種類は、BMEに限らず、他の用地を用いてもよい。血清添加も10%に限らず他の濃度、または無血清でもよく、牛新生児血清の他、成人の血清、仔牛、牛胎児、または他の動物のものを使用することもある。さらに、培養は静置培養やその他浮遊培養系を用いてもよく、培養器も様々なあるので、適宜選択することは自由である。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、各培養地におけるヒト胎盤胎芽細胞由来樹立細胞HRCの増殖を示す図、第2図Aは、各培養地における正常ヒト2倍体皮膚線維芽細胞NASの増殖を示す図、第3図Aは、各培養地にお

けるヒト胎盤胎芽細胞由来樹立細胞KBの増殖を示す図、第5図は、各培養地におけるヒト胎盤性肉腫由来樹立細胞HMSの増殖を示す図、第6図は、ヒト胎盤胎芽細胞由来樹立細胞HRCの培養培養地と新鮮培養地の各種混合比におけるヒト胎盤胎芽細胞HRCの濃度反応を示す図、第7図は、第8図と同様の各培養地における正常ヒト2倍体皮膚線維芽細胞NASの濃度反応を示す図、第9図は、各培養地における癌細胞の増殖を示す図、第10図は、各培養地における正常細胞の増殖を示す図、第11図は、混合培養培養地と新鮮通常培養地との各種混合比率の培養地における正常細胞及び癌細胞の増殖を示す図、第12図は、混合培養培養地と新鮮通常培養地との各種混合比率の培養地における他の種数の癌細胞の増殖を示す図、第13図は、無血清培養地と混合培養培養地の和の

特開昭59- 33223 (5)

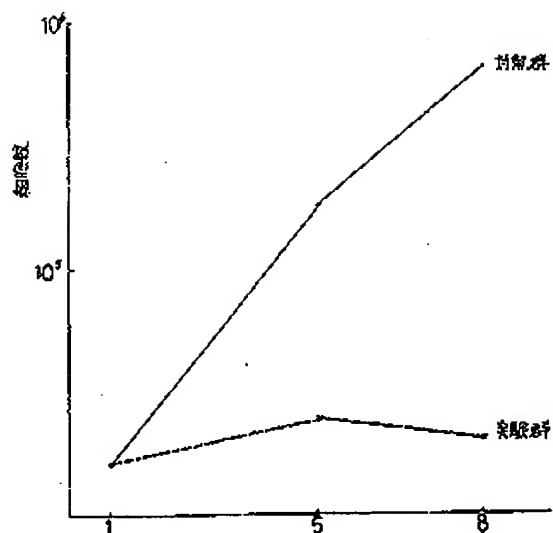
の増殖を示す例である。表1は、各分子量分級の細胞増殖の効果を比較したものである。

出願人代理人 弁理士 竹本 敏 司

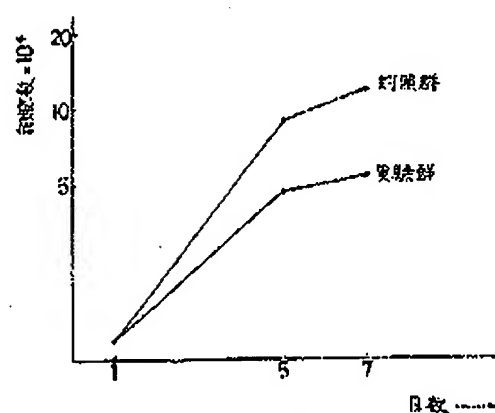
表 1

分 級	NAS 63		HR5	
	細胞数 $\times 10^4$	%	細胞数 $\times 10^4$	%
対照群	6.30	100	21.14	100
① $\leq 10^4$	1.58	25	0.33	1.6
② $\leq 10^4$	1.72	27	0.31	1.5
③ $\leq 10^4$	3.78	60	17.87	85

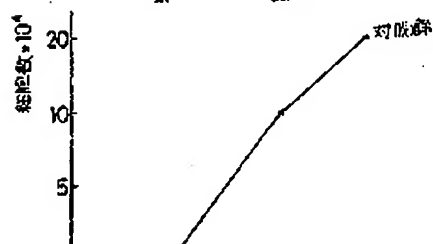
第 1 図



第 2 例 A

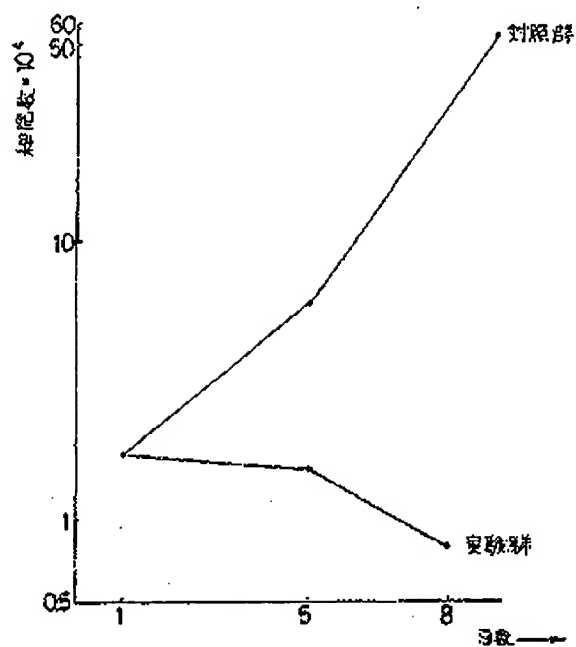


第 2 例 B

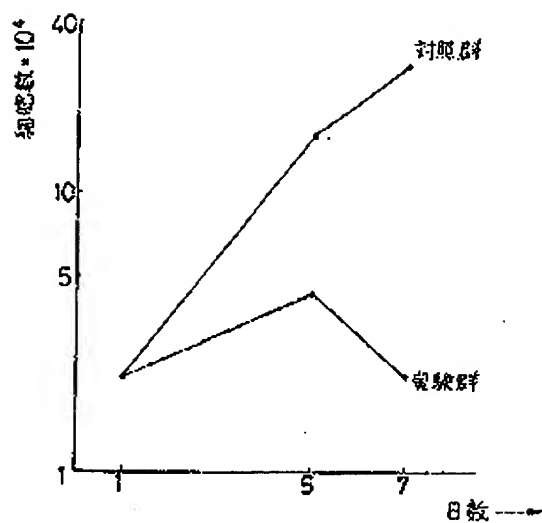


特開昭59-33223(6)

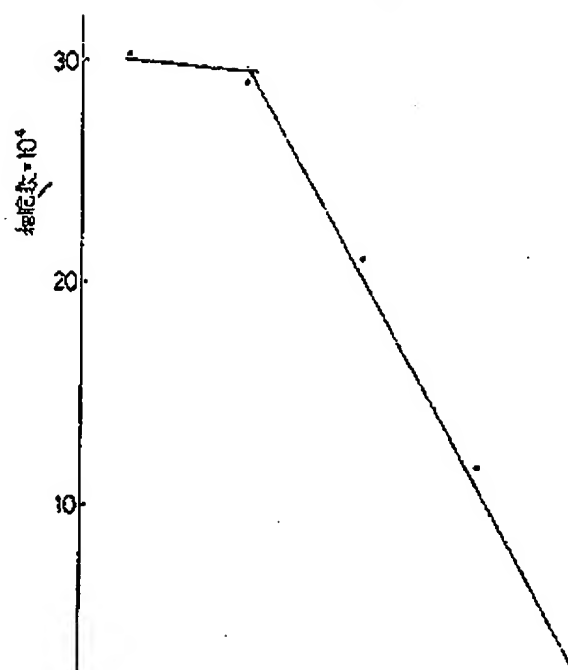
第 3 図



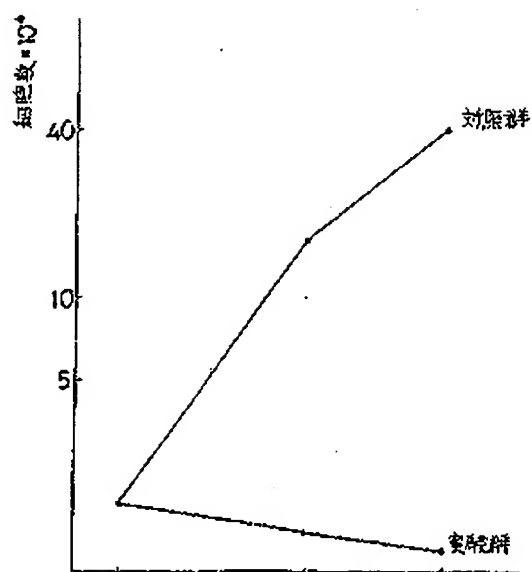
第 4 図



第 6 図



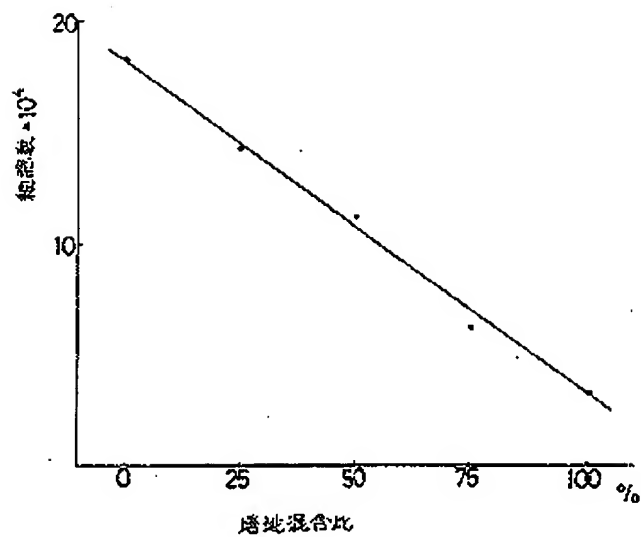
第 5 図





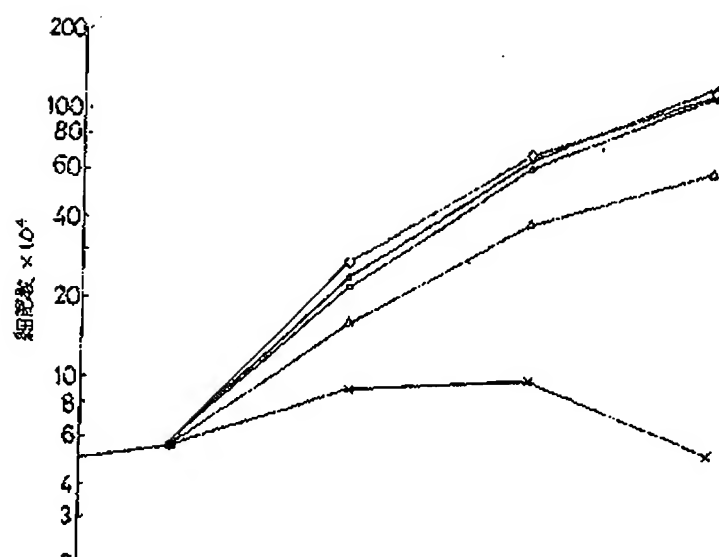
特開昭59- 33223 (7)

第 7 圖



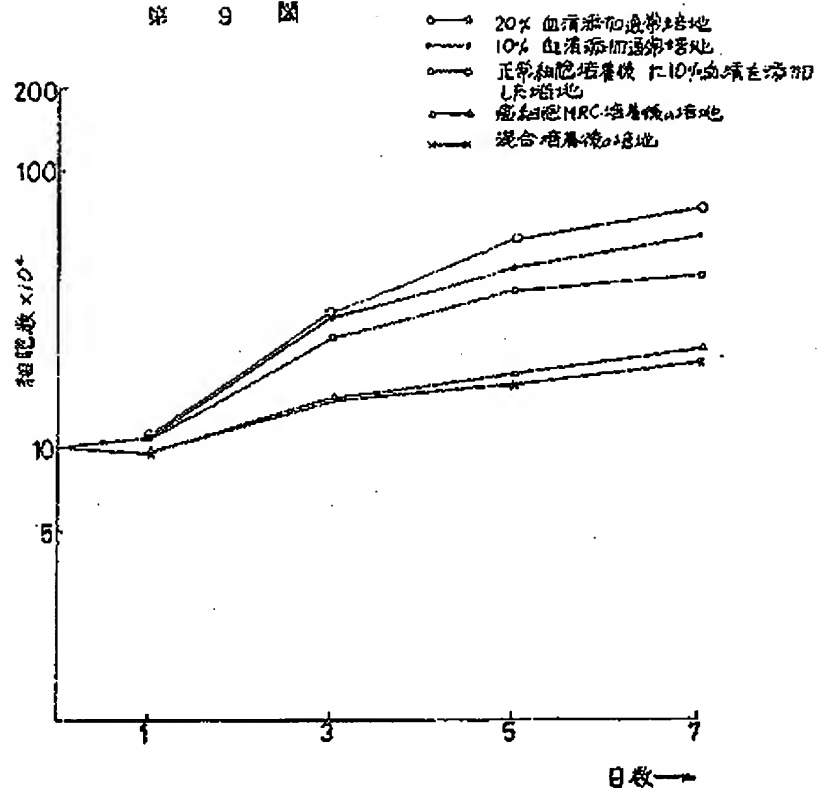
第 8 圖

- 10% 血清添加培養液
- 20% 血清添加培養液
- △ 正常細胞培養液 (10%)
- 血清添加培養液
- 血清添加培養液
- 血清添加培養液

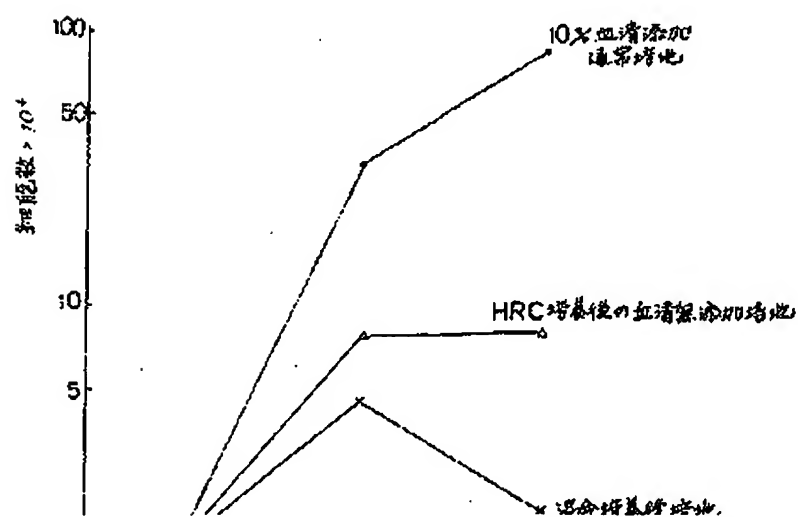


特開昭59- 33223 (8)

第 9 図

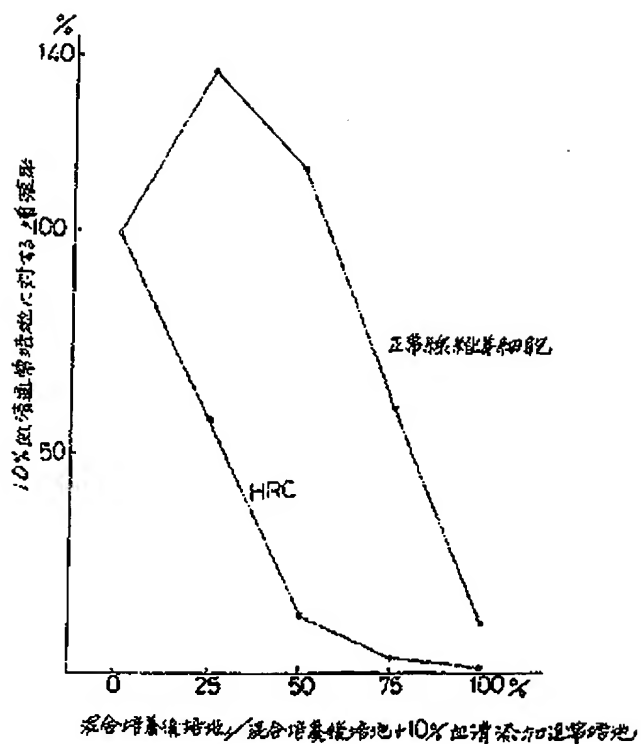


第 10 図

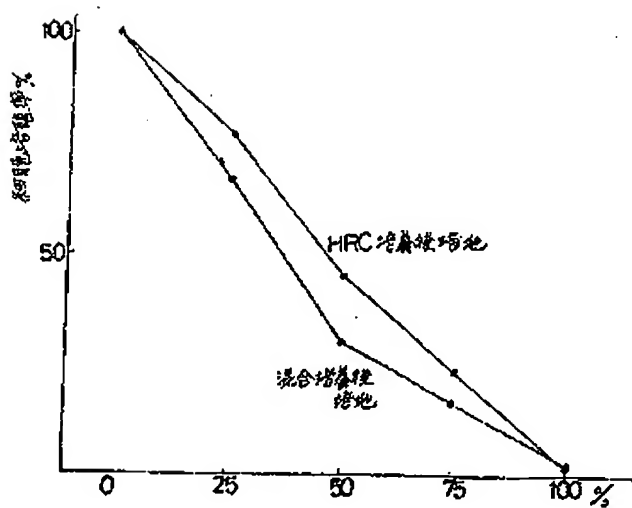


特圖59- 33223(9)

第 11 圖

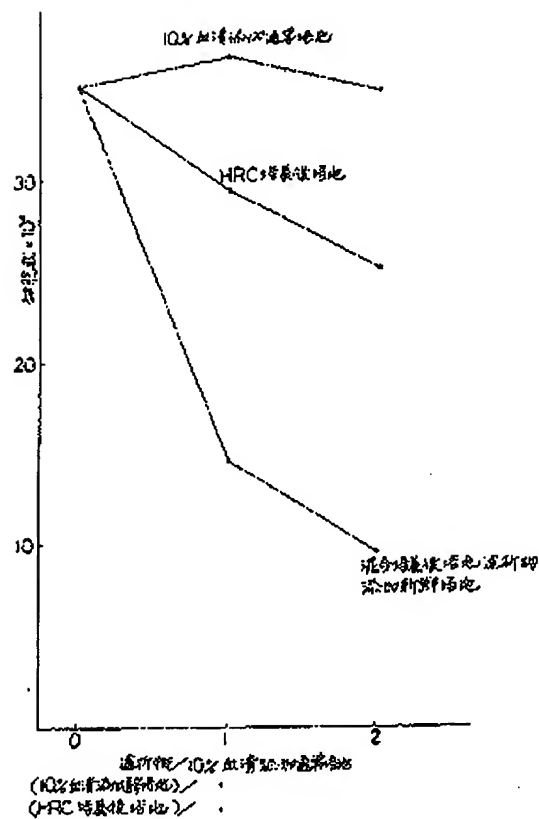


第 12 圖

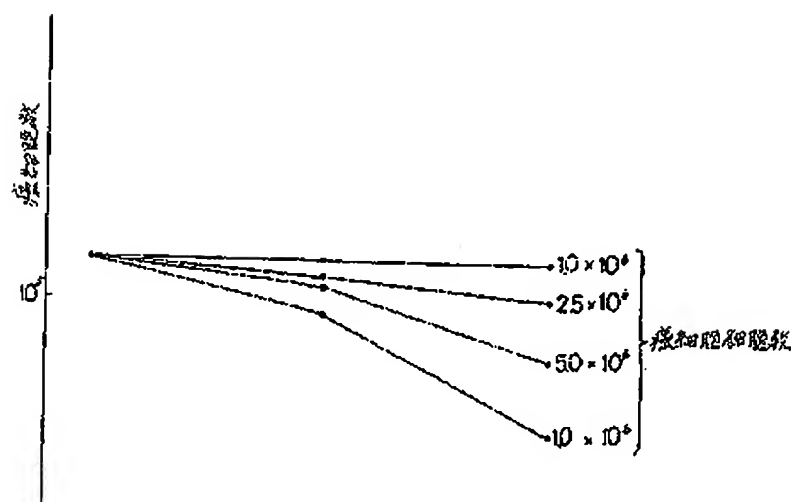


特許第59-33223(10)

第 13 図

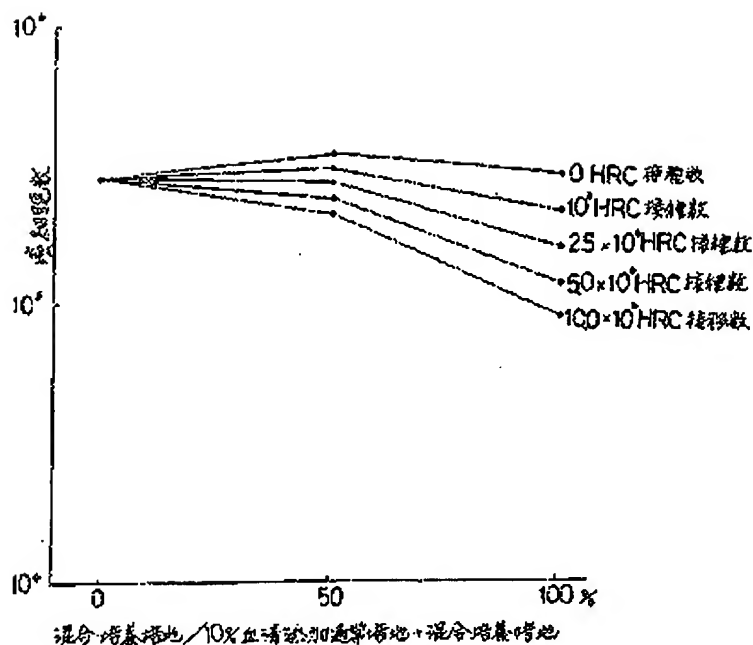


第 14 図



時間 59- 33223 (11)

第 15 図



付 録 補 正 出

昭和57年11月29日

特許庁長官 片 杉 和 人 殿

## 1. 事件の表示

昭和57年 特 許 願 第 143340 号

## 2. 発明の名称

人の悪性腫瘍細胞培養増殖剤

## 3. 補正を要する者

申請との関係 特 許 出 願 人

住所 東京都千代田区西船場7番地

名称 興 業 株 式 会 社

(ほか 3名)

## 4. 代理人 千 105

住所 東京都港区虎ノ門1丁目1番11号虎ノ門ビル6階

氏名 (8230) 代理士 竹 本 悦 司

電話 502-2578

## 5. 補正命令の目的

(な し) (白発補正)

## 6. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

(2) 同上第1頁第12行、第2頁第7行、第8行、

第9行、第3頁第6行、第6～7行、第8行、

第10行、第13行、第14行、第15行、

第4頁第6行(2ヶ所)、第8～9行、第12行

(2ヶ所)、第16行、第19行、第5頁第2行

(2ヶ所)、第17行(2ヶ所)、第6頁第3行、

第7行、第11行、第15行(2ヶ所)、

第7頁第2行(2ヶ所)、第3行、第4頁の「培地」

を「増地」と補正する。

(3) 同上第6頁第19行「をを」を「を」に補正する。

特開昭59- 33223 (12)

特許請求の範囲

手 続 補 正 用 (方式)

昭和57年12月 3日

人の肺がん細胞増殖の促進を抑制し、前記癌細胞増殖を抑制して抽出したものであることを特徴とする人の癌細胞増殖抑制剤。

特許庁長官 杉 和 夫 様

## 1. 事件の表示

昭和57年 特 許 願 第 143340 号

## 2. 発明の名称

人の癌細胞増殖抑制剤

## 3. 補正をする者

事件との関係 特 許 出 願 人

住所 東京都千代田区根岸7番地

名称 興 研 株 式 会 社 (ほか 3 名)

## 4. 代 理 人 平 105

住所 東京都港区虎ノ門 1丁目 3番11号 虎ノ門ビル 6階

氏名 (4250) 弁護士 竹 本 浩 司

電話 502-2578

## 5. 補正命令の日付

昭和57年11月12日(昭和57年11月30日発送)。

## 6. 補正により削除する発明の数 な し

7. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄、図面の欄  
最末の発明の欄並びに図面中の表1。

## 8. 補正の内容

- (1) 明細書第7頁第18行と第8頁第1頁との間に次の表を挿入する。

表 1

分 類	NAS63		URS	
	細胞数×10 <sup>4</sup>	%	細胞数×10 <sup>4</sup>	%
対象群	6.36	100	21.11	100
① 50%	1.58	25	0.33	1.6
② 50%	1.72	27	0.31	1.5
③ 50%以下	3.78	60	17.87	85

- (2) 第1頁15頁第1行～第2行「表1は、……」を「のである。」を挿入する。
- (3) 図面中表1を削除する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**